

14 DEC  
312



PCT/EP00/05066  
09/980485  
EP00/5066

Mod. C.E. - 1-4-7

**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**  
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

4



REC. 25 SEP 2000

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per .....

N. MI99 A 001243

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

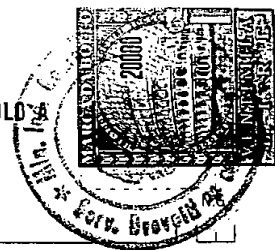
Roma, li 15 09 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

Giovanni Prounani

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA  
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO 4



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **PHARMAPRODUCTS UK LIMITED**  
Residenza **Liverpool (Gran Bretagna) (GB)** codice \_\_\_\_\_  
2) Denominazione \_\_\_\_\_  
Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Bianchetti Giuseppe ed altri** cod. fiscale \_\_\_\_\_  
denominazione studio di appartenenza **Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.**  
via **Rossini** n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) **C07K** gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**"Proteina estraibile da fegato di mammiferi ad attività antitumorale"**

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **Bartorelli Alberto** 3) \_\_\_\_\_  
2) \_\_\_\_\_ 4) \_\_\_\_\_

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

1) \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
2) \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

SCIoglimento RISERVE

Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **2** PROV n. pag. **07**  
Doc. 2) **2** PROV n. tav. **01**  
Doc. 3) **0** **X**  
Doc. 4) **0** RIS  
Doc. 5) **0** RIS  
Doc. 6) **0** RIS  
Doc. 7) **0**

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) .....

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) .....

lettera d'incarico, procura e mandato a trattare .....  
**XXXXXXXXXXXXXX**

designazione inventore .....

documenti di priorità con traduzione in italiano .....

autorizzazione o atto di cessione .....

nominativo completo del richiedente .....

**trecentoquindicimila#**

SCIoglimento RISERVE

Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_

confronta singole priorità  
\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

8) attestati di versamento, totale lire

**trecentoquindicimila#**

obbligatorio

COMPILATO IL **03/06/1999**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

**Minoja Fabrizio**

CONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

**MILANO**

codice **15**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

**MI99A 001243**

Reg. A.

L'anno millenovecento

**NOVANTANOVE**

, il giorno

**TRE**

, del mese di

**GIUGNO**

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n.

**00**

pag. aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

**Bidire**

timbro  
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

M. 99A 001243

REG. I

DATA DI DEPOSITO

0306/1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

D. TITOLO

"PROTEINA ESTRAIBILE DA FEGATO DI MAMMIFERI AD ATTIVITA' ANTITUMORALE"

Classe proposta (sez./cl./scl/)

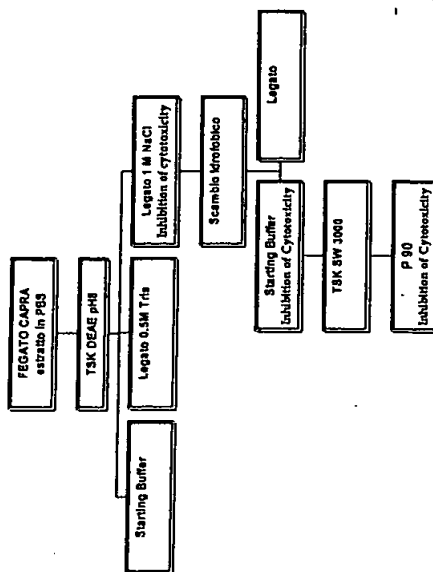
(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

La presente invenzione ha per oggetto una proteina di circa 90 kDa estraibile da fegato di mammiferi in condizioni non acide e capace di indurre anticorpi citotossici verso cellule tumorali.

M. DISEGNO

FIGURA  
PURIFICAZIONE DI P90



5838M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

FM/cv **"PROTEINA ESTRAIBILE DA FEGATO DI MAMMIFERI AD  
ATTIVITA' ANTITUMORALE"**

a nome : **PHARMAPRODUCTS UK LIMITED**

23 GIU. 1999

con sede in: Liverpool (Gran Bretagna)

MI 99 A 001243

\* \* \*

La presente invenzione ha per oggetto una proteina di circa 90 kDa estraibile da fegato di mammiferi in condizioni non acide e capace di indurre anticorpi citossici verso cellule tumorali.

Proteine ad attività antitumorale estraibili con acidi forti da fegato di mammiferi, in particolare da fegato di capra, sono state descritte in WO92/10197

Tali proteine (UK114, p20, p30 etc.) o gli estratti che le contengono (UK101), sono oggetto di numerosi studi farmacologici e clinici (Bartorelli, A., Berra, B., Ronchi, S., Biancardi, C., Cavalca, V., Bailo, Botta M., Arzani, C., e Clemente, C. (1994). Immunochemical reactivity of mammalian liver antigen (UK101) in human tumors and non neoplastic tissues. J. Tumor Marker Oncol. 9, 37-47; Bartorelli, A., Biancardi, C., Cavalca, V., Ferrara, R., Botta, M., Arzani, C., Colombo, I., Berra, B., Ceciliani, F., Ronchi, S., e Bailo, M. (1996). Purification and partial characterization of proteins present in a perchloric acid extract of goat liver cross-reacting with human tumor. J. Tumor marker Oncol. 11, 57-61; Bartorelli, A., Biancardi, C., Cavalca, V., Ferrara, R., Arzani, C., Bailo, M. and Botta, M., (1996). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection of antibodies to UK114 and UK 150. J. Tumor Marker Oncol. 11, 67-80; Bartorelli, A., Zanol, G., Fassio,

F., Botta, M., Ferrara, R., Bailo, M., Biancardi, C., Cavalca, V., Arzani, C., and Maraschin, R., (1994). Toxicological and anti-tumoral activity of UK101, a mammalian liver extract. J.Tumor Marker Oncol. 9, 49-56) che hanno dimostrato la loro capacità di indurre citotossicità mediata da anticorpi di tipo IgG e IgM verso linee cellulari tumorali. Anticorpi diretti contro la proteina UK114 sono in grado di legarsi ad antigeni espressi sulla superficie di cellule tumorali di specie diverse.

Prove immunocitochimiche e di citotossicità effettuate con le proteine acido solubili sopra citate hanno suggerito tuttavia la presenza di altri antigeni che potrebbero essere il bersaglio degli effetti citotossici riscontrati in vitro e in vivo .

Si è ora trovato un antigene di circa 90 kDa in SDS-PAGE estraibile da fegato di mammiferi che è in grado di indurre, se somministrato a pazienti o animali portatori di tumori, una marcata risposta citotossica nei confronti di cellule tumorali .

La proteina dell'invenzione, indicata di seguito per brevità semplicemente come proteina 90 kDa, è ottenibile in particolare per estrazione del fegato di mammiferi con soluzioni tamponate a pH 7.4 (PBS) seguita da precipitazione con polietilenglicol 6000 al 15%, cromatografia su TSK-DEAE a pH 8, eluizione con NaCl 0.3M e purificazione su TSK SW3000.

Il processo dell'estrazione e della purificazione della proteina dell'invenzione è illustrato nell'allegata figura.

Preferibilmente, si utilizza fegato di capra ma si possono impiegare fegati di altri mammiferi (ad esempio di suini, bovini, equini o altri ovini) .

La proteina 90 kDa così ottenuta può essere impiegata nella immunoterapia di tumori, essendo in grado di indurre la formazione di anticorpi citotossici nei confronti di cellule di tumori umani, in particolare di carcinomi e adenocarcinomi.

La citotossicità è qualificabile in vitro su cellule Jurkat e Kato III utilizzando metodi convenzionali, basati ad esempio all'uso di kit commerciali quali il kit CDC $\mu$ K (Pharmaproduct). In particolare, si notava la comparsa di citotossicità nel siero di conigli già dopo un primo trattamento con proteina 90 kDa (1 mg/animale in soluzione fisiologica) su cellule Jurkat e Kato III.

L'invenzione riguarda pertanto anche composizioni farmaceutiche contenenti come ingrediente attivo una dose efficace della proteina 90 kDa.

Le composizioni dell'invenzione potranno essere somministrate utilizzando le vie di somministrazione convenzionali per proteine e polipeptidi, ad esempio la via sottocutanea o intramuscolare. Il trattamento può essere ripetuto ed è preferibile un trattamento che prevede somministrazioni distanziate di una-due settimane di dosi comprese tra 0.1 e 20 mg di proteina 90 kDa.

Si è inoltre sorprendentemente trovato che è possibile indurre elevata citotossicità anche somministrando la proteina a dosaggi molto bassi, dell'ordine di  $1 \cdot 10^4$  -  $1 \cdot 10^{10}$  g, per via sublinguale, sotto forma di granuli o gocce di soluzioni o sospensioni idroalcoliche all'1% di etanolo, con concentrazioni di principio attivo variabili da  $10^{-6}$  a  $10^{-10}$  M.

Il seguente esempio illustra l'invenzione in maggior dettaglio.



## ESEMPIO

### Estrazione

50 gr di fegato di capra vengono omogenati e ripresi ad un volume finale con 400 ml di PBS 0.01 M Ph 7.2.

Si agita per 30 minuti a 4°C e si centrifuga su JA14 a 14.000 RPM per 30 minuti.

Si filtra su bukner; 1.2  $\mu$ m finale si 0.45  $\mu$ m.

Volume: 340 ml conc. 10.9 mg/ml.

### Precipitazione frazionata PEG 6000.

I 336 ml del campione sopraindicato, vengono trattati con PEG 6000 in polvere al 5% (16.8g).

Agitando per 1 ora a 4°C. Si centrifuga su J 6 a 4000 g per 30'.

Il pellet viene ripreso con 61 ml di Tris/HCl 0.03 M pH 8, mentre il surnatante (340 ml) viene riprecipitato con PEG 6000 al 5% (17 g), quindi 10% finale agitando per 1 ora a 4°C.

Si centrifuga su J6 a 4000 g per 30' e si riprende il pellet con 62 ml di Tris/HCl 0.03 M pH8.

Il surnatante 345 ml viene trattato con PEG 6000 al 5% (17.25 g) quindi finale 15%, agitando per 1 ora a 4°C.

Si centrifuga su J6 a 4000 g per 30'.

Il surnatante viene eliminato, mentre il pellet viene ripreso con 200 ml di Tris/HCl 0.03 M pH8.

Pellet PEG 5% volume: 61 ml conc. 9.34 mg/ml.

Pellet PEG 10% volume: 62 ml conc. 13 mg/ml.

Pellet PEG 15% volume: 200 ml conc. 3.38 mg/ml.



DEAE - Sephacell

Circa 150 ml di resina DEAE-S. vengono equilibrati in tampone Tris/HCl 0.03 M pH 8.

Si incuba la resina con il campione PEG 15% per 30 minuti a t.a. + 200 ml di lavaggio.

LEG 1: 200 ml Tris/HCl 0.5 M pH 8 per 30 minuti a t.a. + 200 ml di lavaggio.

LEG 2: 200 ml Tris/HCl 0.03 M pH 8 + 0.3 M NaCl per 30 minuti a t.a. + 200 ml di lavaggio.

LEG 3: 200 ml Tris/HCl 0.03 M pH 8 + 1 M NaCl per 30 minuti a t.a. + 200 ml di lavaggio.

Si ottengono così i seguenti campioni:

S.B. volume: circa 400 ml conc: 294  $\gamma$ /ml.

LEG 1 volume: circa 400 ml conc: 1.14  $\gamma$ /ml.

LEG 2 volume: circa 400 ml conc: su PM 30.

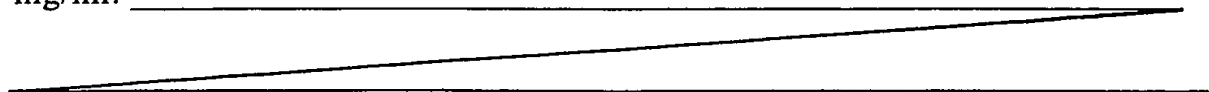
LEG 3 volume: circa 400 ml conc: 137  $\gamma$ /ml.

Il LEG 2 viene conc. su PM 30 ad un volume finale di circa 20 ml alla conc. di circa 3.6 mg/ml.

SW3000 prep.

Il LEG 2 da DEAE-S. sopracitato, viene purificato in SW3000 prep. (10 cariche da 2 ml).

Si eluiscono quattro frazioni, la seconda delle quali viene concentrata su PM 30 e dializzata contro H<sub>2</sub>O a vol. finale di circa 2 ml alla conc. di circa 1.5 mg/ml.



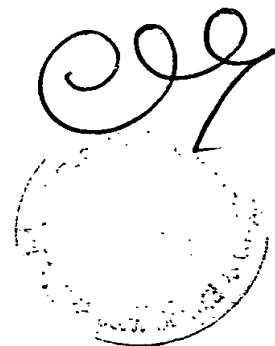


## RIVENDICAZIONI

1. Una proteina di circa 90 kDa estraibile da fegato di mammiferi in condizioni non acide e capace di indurre anticorpi citotossici verso cellule tumorali.
2. Proteina secondo la rivendicazione 1, da fegato di capra.
3. Proteina secondo la rivendicazione 1 o 2, ottenibile per estrazione del fegato di mammiferi con soluzioni tamponate a pH 7.4 (PBS) seguita da precipitazione con polietilenglicol 6000 al 15%, cromatografia su TSK-DEAE a pH 8, eluizione con NaCl 0.3M e purificazione su TSK SW3000.
4. Uso della proteina delle rivendicazioni 1-3 per la preparazione di medicinali antitumorali.
5. Composizioni farmaceutiche contenenti come ingrediente attivo la proteina delle rivendicazioni 1-3.
6. Anticorpi citotossici indotti dalla somministrazione della proteina delle rivendicazioni 1-3.

Milano, 3 giugno 1999

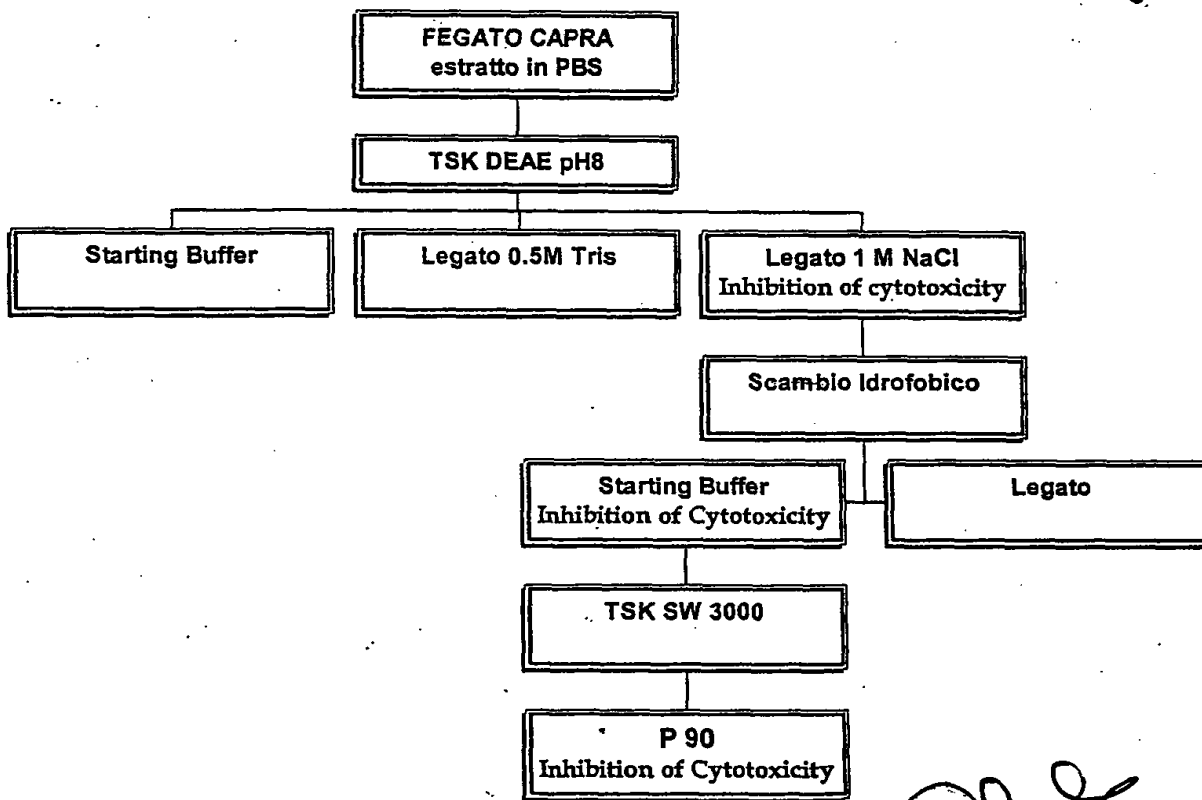
Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.



FIGURA

## PURIFICAZIONE DI P90

MI 99 A 001243



Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.

